



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <i>S</i> :</b> <b>C07K 3/24, C12N 15/15</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/10677</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Juli 1991 (25.07.91)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP90/02269 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 20. Dezember 1990 (20.12.90) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 40 01 238.7 18. Januar 1990 (18.01.90) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> LANG, Kurt [DE/DE]; Birkenstrasse 159, D-8122 Penzberg (DE). KREIMEYER, Andreas [DE/DE]; Uhlandstraße 5, D-6725 Roemerberg (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
<b>(54) Title: PROCESS FOR ENRICHING OR CLEANING BIOMOLECULES</b> <b>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG BZW. REINIGUNG VON BIOMOLEKÜLEN</b> <b>(57) Abstract</b> <p>In a process for enriching or cleaning biomolecules, the biomolecule is introduced into an aqueous-organic solvent system and salts are added to separate the phases. The pH at which the enrichment is carried out, suitable solvents for the aqueous-organic system and the type of salt are determined in a series of tests.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Es wird ein Verfahren beschrieben zur Anreicherung bzw. Reinigung von Biomolekülen, welches darin besteht, daß man das Biomolekül in ein wässrig-organisches Lösungsmittelsystem bringt und durch Zugabe von Salzen eine Phasentrennung herbeiführt, wobei der pH-Wert, bei dem die Anreicherung erfolgt, die Lösungsmittel, die sich für das wässrig-organische Lösungsmittelsystem eignen, und die Art des Salzes in einer Versuchsreihe ermittelt werden.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

## Verfahren zur Anreicherung bzw. Reinigung von Biomolekülen

## Beschreibung

5 Effektive und kostengünstige Reinigungsverfahren spielen bei der Herstellung chemischer und biologischer Produkte eine zentrale Rolle. Im Zuge der Entwicklung der Bio- und Gentechnologie in den letzten Jahren hat insbesondere die Verfahrensentwicklung zur Reinigung von Proteinen, Peptiden und Vitaminen im technischen Maßstab zunehmend Bedeutung erlangt.

10

Ein wichtiger Schritt bei der Isolierung der meisten zellulären Inhaltsstoffe ist die Fraktionierung des Ausgangsmaterials oder einer Zwischenstufe im Verlauf der Reinigung. Hierzu werden in der Regel (fraktionierte) Fällungen oder Verteilungschromatographien angewendet. Zur

15 Durchführung von Fällungen werden die Eigenschaften des Lösungsmittels durch die Zugabe entsprechender Reagenzien derart verändert, daß die Löslichkeit des Proteins stark abnimmt und dieses ausfällt. Die Löslichkeit kann durch die Zugabe von Salzen wie Ammoniumsulfat oder organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder durch eine Veränderung des pH-Wertes oder  
20 der Temperatur variiert werden, (Green, A.A. & Hughes W.L. in "Methods in Enzymology", Band I, S. 67-90 (1955); Belter et al, 1988, Seite 100ff. in "Bioseparations", Hrsg.: Belter, P.A., Cussler, E.L. & Hu, W.-S.).

Auch Flüssig-Flüssig-Zwei-Phasen Verteilungschromatographien werden seit  
25 langem zur Reinigung von Biomolekülen eingesetzt. In den 40er und 50er Jahren wurden ausschließlich organisch-wäßrige Zwei-Phasen-Systeme mit nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln verwendet. Diese sind zwar zur Anreicherung und Reinigung niedermolekularer Biomoleküle wie Antibiotika und Vitamine sehr geeignet (Schlügerl, K., 1987, in  
30 "Separations for Biotechnology", Hrsg.: Verral, M.S. & Hudson, M.J. S. 260-269), ihrem Einsatz bei der Isolierung insbesondere von Proteinen sind jedoch enge Grenzen gesetzt. Insbesondere die Denaturierung und Präzipitation der Proteine in den organisch-wäßrigen Systemen bereitet große Probleme (Johansson G., 1985, in "Partitioning in aqueous two-phase  
35 systems", Acad. Press, S. 161-225).

Eine andere Methode zur Flüssig-Flüssig-Zwei-Phasen-Extraktion wurde Ende der 50er Jahre von Albertson entwickelt. Er verwendete 2-Phasen-Systeme mit zwei wäßrigen Phasen und konnte zeigen, daß diese insbesondere zur  
40 Anreicherung von Proteinen sehr geeignet sind (Nature 182, 709 (1958)). Zur Extraktion von Proteinen mit 2-Phasen-Systemen wurden seitdem fast ausschließlich wäßrige 2-Phasen-Systeme verwendet und weiterentwickelt.

Aufgrund der hohen Einsatzstoffkosten für die phaseninduzierenden Polymere wie Polyethylenglykol oder Dextran werden wäßrige 2-Phasen-Extraktionen im technischen Maßstab jedoch nur selten durchgeführt.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Anreicherung bzw. Reinigung von Biomolekülen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Biomolekül in einer Mischung aus Wasser und/oder einem Puffer und einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel löst und es bei der anschließend durch die Zugabe von Salzen herbeigeführten Phasentrennung in einer der sich
- 10 trennenden Phasen anreichert, wobei der pH-Wert, bei dem die Anreicherung erfolgt, die Lösungsmittel, die sich für die Extraktion des Biomoleküls eignen, und die Art des Salzes in einer Versuchsreihe ermittelt werden.

- Als Biomoleküle kommen besonders Vitamine und vorzugsweise Proteine und
- 15 Peptide in Betracht. Zur Durchführung des Verfahrens wird das Biomolekül zunächst in Wasser oder einen Puffer und/oder unmittelbar in ein wäßrig-organisches Lösungsmittelsystem gebracht.

- Bei der Zugabe des organischen Lösungsmittels zu der wäßrigen Phase muß
- 20 darauf geachtet werden, daß das zu reinigende Protein in Lösung bleibt. Falls das Protein nicht in Lösung bleibt, empfiehlt es sich, den pH-Wert, die Temperatur, den Anteil und die Art des organischen Lösungsmittels, die Art des Puffers und dessen Konzentration, die Proteinkonzentration und die Art und Konzentration des Salzes zu variieren. Fällt bei der Zugabe des
- 25 organischen Lösungsmittel eine andere Substanz aus, wird diese abzentrifugiert oder abfiltriert. Als Lösungsmittel eignen sich besonders 1- und 2-Propanol, Aceton, THF und Acetonitril. Zur Reinigung von Hirudin eignen sich am besten n-Butanol und 2-Propanol.

- 30 Zu der so erhaltenen Lösung wird zur Phasentrennung das Salz zugegeben. Als Salze kommen beispielsweise Alkalichloride- wie Lithium-, Natrium-, Kalium- oder Cäsiumchlorid-, Calciumchlorid, Mangan(II)chlorid, Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrit, Magnesiumsulfat, Natriumformiat, Natriumacetat, Natriumcitrat, Kalium-Natrium-Tartrat und Kaliumcarbonat in Betracht. An
- 35 Stelle eines Salzes kann auch z.B. D-Sorbit verwendet werden. Welches Salz am besten geeignet ist, wird wiederum in einem Vorversuch ermittelt. Dasselbe gilt für die Salzmenge. In der Regel ist die Phasentrennung am besten, wenn so viel Salz zugegeben wird, daß die Phasen mit dem Salz gesättigt sind.

40

Zur Reinigung von Hirudin eignen sich besonders Natriumchlorid und Ammoniumsulfat. Bei der Wahl der richtigen Parameter ist auch darauf zu achten, daß das Protein nach der Phasentrennung ganz überwiegend in der

in der wäßrigen Phase vorliegt. Für die Wahl der Parameter läßt sich keine allgemeine Regel aufstellen, es empfiehlt sich, die Parameter in einigen Vorversuchen zu ermitteln.

5 Tritt bei der Phasentrennung ein Niederschlag auf, so wird dieser verworfen.

Aus der wäßrigen Phase wird das Protein in bekannter Weise beispielsweise durch hydrophobe Chromatographie oder Fällung isoliert. Es kann auch wei-  
10 teren Reinigungsschritten unterworfen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist schnell, kostengünstig und einfach durchführbar. Es zeichnet sich gegenüber dem bisherigen organisch-wäßrigen Extraktionen dadurch aus, daß das zu reinigende Protein in der organisch-  
15 wäßrigen Mischphase gelöst bleibt und erst durch die anschließende Phasentrennung bevorzugt in die sich abtrennende wäßrige Phase übergeführt wird. Ein besonderer Vorteil des neuen Verfahrens ist es, daß die Proteine sich aufgrund der Verwendung von mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln ständig in einem wäßrigen Milieu befinden. Unter geeigneten  
20 Bedingungen können viele Proteine daher in aktiver Form angereichert werden.

Das Verfahren kann aber auch zur Anreicherung von inaktiven bzw. denaturierten Proteinen verwendet werden.

25

Beispiel 1

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Hirudin-haltigem Zell-  
extrakt

30

Es wurde von einem grob vorgereinigten Zellextrakt aus *E. coli* ausgegangen, der neben Hirudin noch zahlreiche Fremdproteine, Peptide sowie teilweise gefärbte Bestandteile des Fermentationsmediums und der Zellen enthielt. Hirudin war zu etwa 10 % angereichert (bezogen auf das Protein).

35

Eine wäßrige Lösung dieses Extraktes mit einer Proteinkonzentration von 10 - 100 mg/ml wurde bei 0 - 20°C mit 1 Volumen i-Propanol versetzt und der pH-Wert der Mischphase mit 2N HCl auf pH 1 - 2 eingestellt. Ausgefallenes Material wurde durch Zentrifugation (30 min, 10000 g, 0 - 20°C)  
40 oder Filtration abgetrennt. Der Überstand bzw. das Filtrat wurde anschließend mit 2N NaOH auf pH 4 - 4,3 eingestellt und unter Rühren mit festen NaCl bis zur Sättigung versetzt. Nach Beendigung des Rührvorganges

setzte eine spontane Trennung der organischen und wäßrigen Phasen ein. Zugleich bildete sich zwischen der organischen und der wäßrigen Phase eine flächige massive Interphase überwiegend aus ausgefallenen Proteinen. Das Hirudin befand sich fast ausschließlich in der wäßrigen Phase. Die Ausbeute an aktivem Hirudin in der wäßrigen Phase betrug 70 - 90 %. Eine weitere Ausbeuteerhöhung ist möglich, wenn die organische Phase wiederholt mit H<sub>2</sub>O/Kochsalz extrahiert wird.

Durch die Extraktion wurde das Hirudin um mindestens den Faktor 5 angereichert. Weiterhin wurden (teilweise gefärbte) hydrophobe Verunreinigungen in die i-Propanolphase überführt, die nach der Phasentrennung eine stark dunkle Färbung aufwies.

#### Beispiel 2

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit einem grob angereichertem Protein A-Hirudin-Fusionsprotein

Als Ausgangsmaterial wurde der Niederschlag der Fällung eines Zellaufschlusses von E. coli verwendet. Er erhielt inaktives Hirudin in Form eines Fusionsproteins mit den N-terminalen Bereich des Protein A aus Staphylococcus aureus. Der Proteinanteil des Fusionsproteins am Gesamtprotein betrug ca. 40 %. Neben Fremdproteinen enthielt der Niederschlag große Mengen an Zell- und Fermentationsbestandteilen.

Der Niederschlag wurde zu einer Konzentration von 50 g Niederschlag/l in Wasser aufgenommen. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 40 %iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bzw. 2N NaOH auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurde 1 Volumen i-Propanol zugegeben und der pH-Wert der Mischphase erneut auf pH 5 eingestellt, unlösliches Material wurde durch Zentrifugieren (10000 g, 15 min, 20°C) abgetrennt. Der pH-Wert des Überstandes wurde nun mit 2N NaOH auf pH 7 eingestellt. Darauf wurde der Überstand unter Rühren mit festem NaCl bis zu einer Konzentration von 1,5 M NaCl versetzt. Nach Beendigung des Rührvorganges erfolgte eine spontane Trennung der organischen und wäßrigen Phase, wobei sich zwischen diesen eine Interphase aus überwiegend denaturierten Proteinen bildete.

Das Protein A-Hirudin-Fusionsprotein befand sich annähernd quantitativ in der wäßrigen Phase. Das Fusionsprotein hat einen Anteil am Gesamtprotein in der wäßrigen Phase von ca. 80 %. Neben Fremdprotein wurden durch die Extraktion vor allem DNA sowie hydrophobe und unter den Extraktions-

bedingungen schlecht lösliche Zellinhaltsstoffe und Bestandteile des Fermentationsmediums stark abgereichert. Die weitere Aufarbeitung des Fusionsproteins wurde dadurch stark vereinfacht.

5 Eine Anreicherung des Protein A-Hirudin-Fusionsproteins ist auch in der organischen Phase möglich. Dies wird erreicht, wenn die Phasentrennung nicht wie oben beschrieben, bei pH 7, sondern bei pH 1,5 durchgeführt wird. Der pH-Wert wird vor der Salzzugabe mit 2 N HCl eingestellt.

10 Das grob angereicherte Protein A-Hirudin-Fusionsprotein wurde wie folgt erhalten:

#### Herstellung des Expressionsplasmids

##### 15 a) Konstruktion des Vektors

Der Protein A-Vektor pRIT 2T (Figur 1) ist kommerziell erhältlich und ausführlich beschrieben (Pharmacia Bestell-Nr. 27-4808-01).

20 Dieser Vektor wurde wie folgt modifiziert: Er wurde mit der Restriktionsendonuklease Hind III gespalten. Das größere Fragment (Vektor) wurde durch Elektroelution aus einem Agarosegel isoliert. In diesen Vektor wurden die komplementären Oligonukleotide Koe 1/2 (Sequenz 1) einligiert. Das entstandene chimäre Plasmid wurde in den  
25 Lambda-Lysogenstamm N 4830-1 (Pharmacia Best.Nr. 27-4808-01) transformiert. Der Klon mit der korrekten Orientierung der Oligonukleotide wurde mit Hilfe einer Hind III/EcoRI Restriktionskartierung aus den möglichen Rekombinanten herausgesucht und durch DNA-Sequenzierung überprüft. Dieses Expressionsplasmid wurde pRIT 2TA genannt.

30

##### b) Einsetzen eines synthetischen Hirudingens mit Adapter

Die pRIT 2TA-DNA wurde mit EcoRI und SalI geschnitten und das größere DNA-Fragment (a) mit Hilfe der Elektroelution aus einem Agarosegel  
35 isoliert.

Ein synthetisches Hirudingens (Sequenz 6) wurde mit Hilfe eines DNA-Synthesegeräts (Applied Biosystems, Modell 380A) hergestellt. Dazu wurden 4 Oligonukleotide (Koe 3-Koe 6) angefertigt (Sequenzen 2-5). Die  
40 Oligonukleotide wurden kinasiert und mit EcoRI/SalI linearisierten Plasmid pUC 18 ligiert. Die Konstruktion wurde mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung überprüft. Aus diesem chimären Plasmid (pUC 18-Hir)

wurde das Hirudingen (b) inklusive Adapter mit EcoRI herausgeschnitten und über Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert. Das synthetische Hirudingen beinhaltet neben zwei Stop-Kodons am 3'-Ende und der Sall-Erkennungsstelle eine Adaptersequenz, die das Hirudingen unter Beibehaltung des Leserasters an den Protein A-Fusionspartner über die EcoRI-Spaltstelle anknüpft.

Die isolierten DNA-Fragmente a und b wurden miteinander ligiert und in den lysogenen Stamm N 4830-1 transformiert. Es entstand so der Protein A-Hirudin Expressionsvektor pRIT2TA-Hir (Fig. 2).

#### Expression des Fusionsproteins

Das Expressionsplasmid pRIT 2TA-Hir wurde in den Stamm E.coli N 4830-1 (Pharmacia Bestell-Nr. 27-4808-01) transformiert. Dieser Stamm enthält chromosomal den thermosensitiven Lambda-Repressor CI 857.

In einem 1l Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 100 ml MIM-Medium (MIM = 32 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g NaCl, 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pro Liter und 0,1 mM  $\text{MgSO}_4$  sowie 0,001 mM  $\text{FeCl}_3$ ) sterilisiert und Ampicillin (ad 100  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben. Das Medium wurde mit 1 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur des Stammes pRIT 2TA-Hir/N 4830-1 angeimpft und unter Schütteln so lange bei 28°C bebrütet, bis die Absorption bei 550 nm 0,6 betrug. Dann wurden 100 ml 65°C warmes frisches MIM/amp-Medium zugegeben und weitere 4 h bei 42°C bebrütet. In dieser Zeit wurde das gewünschte Fusionsprotein synthetisiert. Durch Zugabe von Lysozym zu 75 mg/l und Inkubation (3h, 37°C) wurde die Zellwand enzymatisch entfernt. Die Zellen konnten dann mechanisch (Manton-Gaulin Presse, Einfrierzyklus, heftiges Rühren), durch einen Hitzeschock bis 80°C oder eine hypotone Lyse aufgeschlossen und das lösliche Fusionsprotein ins Medium freigesetzt werden.

#### Beispiel 3

Organisch-wässrige Verteilungschromatographie mit Hirudin und verschiedenen Phasensystemen

Zur Durchführung der Verteilungschromatographien mit Hirudin mit verschiedenen Lösungssystemen und Salzen wurde von einer wässrigen Hirudinlösung der Konzentration 1 mg/ml in 20 mM Natriumacetat, pH 4,0 ausgegangen.



Mit mehreren Kombinationen von verschiedenen Lösungsmitteln und Salzen konnte das Hirudin stark überwiegend in der wäßrigen Phase angereichert werden (vgl. Tab. 1).

5

10

15

20

25

30

35

40

Tabelle 1

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Hirudin in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und Salzen

Salzart	Lösungsmittel System (v/v = 50/50)	Volumenanteil nach Phasentrennung (%)		Aktivitätsverteilung nach Phasentrennung %	
		untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere Phase Phase	untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere Phase Phase
NaCl	2-Propanol/H <sub>2</sub> O	48	52	> 90	< 10
	Aceton/H <sub>2</sub> O	75	25	> 90	< 10
	Acetonitril/H <sub>2</sub> O	58	42	> 90	< 10
	THF*/H <sub>2</sub> O	40	60	> 80	< 10
	1-Propanol/H <sub>2</sub> O	48	52	> 80	< 10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2-Propanol/H <sub>2</sub> O	40	60	> 60	< 40
	Aceton/H <sub>2</sub> O	30	70	> 80	< 10
	Acetonitril/H <sub>2</sub> O	40	60	> 80	< 10
	THF*/H <sub>2</sub> O	40	60	> 50	< 10
	1-Propanol/H <sub>2</sub> O	40	60	> 80	< 10

\*THF = Tetrahydrofuran

Tabelle 2

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Hirudin in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und Salzen

Salzart	Lösungsmittel System (v/v = 50/50)	Volumenanteil nach Phasentrennung (%)		Aktivitätsverteilung nach Phasentrennung %	
		untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere Phase Phase	untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere Phase Phase
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2-Propanol/H <sub>2</sub> O	70	30	> 60	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	"	40	60	60	40
CsCl	"	60	40	> 80	40
CaCl <sub>2</sub>	"	60	40	> 30	-
K-Na-Tartrat	"	20	80	> 40	-
LiCl	"	60	40	nicht bestimmt	-
MnCl <sub>2</sub>	"	60	40	> 80	-
MgSO <sub>4</sub>	"	30	70	nicht bestimmt	-
CH <sub>3</sub> COONa	"	80	20	> 70	-
NaCl	"	48	52	> 90	< 10
Na-citrat	"	20	80	> 40	-
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	"	50	50	nicht bestimmt	-

## Beispiel 4

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Chymotrypsin A<sub>4</sub> und verschiedenen Phasensystemen.

5

Zur Durchführung der Verteilungschromatographien wurde von einer wäßrigen Chymotrypsinlösung der Konzentration 1 mg/ml ausgegangen.

Die Chymotrypsinlösung wurde in Aliquots zu je 5 ml aufgeteilt und die  
10 Ansätze mit 1 Volumen der verschiedenen organischen Lösungsmittel (siehe Tab. 2) versetzt und gemischt. Die Mischphasen wurden bei Raumtemperatur (20°C) mit NaCl oder D-Sorbit (siehe Tab. 3) zur Sättigung unter Rühren versetzt. Nach Beendigung des Rührvorganges setzte die Phasentrennung spontan ein. In Tab. 3 sind die Volumina der überwiegend wäßrigen unteren  
15 Phase, die Volumina der überwiegend organischen oberen Phase sowie die in diesen Phasen befindlichen Aktivitäten wiedergegeben.

Die Chymotrypsinaktivität wurde anhand des Umsatzes des Substratpeptids N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilin bestimmt (Anal. Biochem. 99, 316  
20 (1979)).

25

30

35

40

Tabelle 3

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Chymotrypsin in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und Salzen

Salzart	Lösungsmittel- System (v/v = 1/1)	Volumenanteil		Aktivitätsverteilung	
		nach Phase untere Phase (H <sub>2</sub> O)	nach Phasentrennung (%) obere organ. Phase	nach Phasentrennung % untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere organ. Phase
NaCl	n-Propanol/H <sub>2</sub> O	50	50	> 80	-
	i-Propanol/H <sub>2</sub> O	50	50	> 80	-
	Acetonitril/H <sub>2</sub> O	60	40	> 40	-
D-Sorbit	i-Propanol/H <sub>2</sub> O	30	70	> 80	-

## Beispiel 5

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Folsäure in verschiedenen Phasensystemen.

5

Zur Durchführung der Verteilungschromatographien wurde von einer wäßrigen Folsäure-Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml in 20 mM Natriumphosphat pH 7,0 ausgegangen. Je 5 ml der Folsäurelösung wurden mit jeweils 5 ml der mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln (siehe Tab. 4) bei 10 Raumtemperatur (20°C) gemischt. Zur anschließenden Trennung der Lösungsmittel in die wäßrige und organische Phase wurden unter Rühren verschiedene Salze (siehe Tab. 4) bis zur Sättigung zugegeben. Die Phasentrennung erfolgte spontan nach Beendigung des Rührvorganges.

15 Die Volumina der wäßrigen und organischen Phasen nach der Phasentrennung sowie die in diesen enthaltenen Anteile an Folsäure sind in Tab. 4 gezeigt. Die in den verschiedenen Phasen enthaltenen Folsäuremengen wurden spektroskopisch bestimmt. Hierzu wurde die Absorption der Phasen bei 346 nm ermittelt. Der Gehalt der Phasen an Folsäure wurde unter Berücksichtigung der verschiedenen Volumina mittels der Absorption einer Folsäurelösung bekannter Konzentration (0,1 mg/ml in 20 mM Natriumphosphat, 20 pH 7,0) bei 346 nm berechnet.

Mit einer Vielzahl der verwendeten Lösungsmittelsysteme kann die Folsäure 25 annähernd quantitativ in der wäßrigen Phase angereichert werden. Einige Systeme (z.B. Isopropanol/H<sub>2</sub>O/Lithiumchlorid) ermöglichen jedoch auch eine Anreicherung in der organischen Phase.

30

35

40

Tabelle 4

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Folsäure in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und Salzen

Salzart	Lösungsmittel- System (v/v = 1/1)	Volumenanteil nach Phasentrennung (%)		Folsäureverteilung nach Phasentrennung %	
		untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere organ. Phase	untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere organ. Phase
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Aceton/H <sub>2</sub> O	30	70	< 40	> 60
	Acetonitril/H <sub>2</sub> O	45	55	> 80	< 20
	Isopropanol/H <sub>2</sub> O	35	65	> 80	< 20
	1-Propanol/H <sub>2</sub> O	35	65	> 60	< 40
	Tetrahydrofuran/H <sub>2</sub> O	70	30	> 60	< 40
NaCl	Aceton/H <sub>2</sub> O	30	60	> 60	< 40
	Acetonitril/H <sub>2</sub> O	60	40	> 80	< 20
	Isopropanol/H <sub>2</sub> O	45	55	> 80	< 20
	1-Propanol/H <sub>2</sub> O	45	55	> 80	< 20
	Tetrahydrofuran/H <sub>2</sub> O	45	55	> 70	< 30

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Organisch-wäßrige Verteilungschromatographie mit Folsäure in verschiedenen Lösungsmittelsystemen und Salzen

Salzart	Lösungsmittel- System (v/v = 1/1)	Volumenanteil nach Phasentrennung (%)		Folsäureverteilung nach Phasentrennung %	
		untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere organ. Phase	untere Phase (H <sub>2</sub> O)	obere organ. Phase
Ammoniumnitrat	Isopropanol/H <sub>2</sub> O	60	40	> 80	< 20
Calciumchlorid	"	50	50	> 70	< 30
Cäsiumchlorid	"	60	40	> 80	< 20
Kaliumcarbonat	"	45	55	> 70	< 30
Kalium-Natrium- Tartrat	"	20	80	< 40	> 60
Lithiumchlorid	"	40	60	< 30	> 70
Magnesiumsulfat	"	20	80	< 40	> 60
Natriumacetat	"	55	45	> 80	< 20
Natriumcitrat	"	20	80	< 40	> 60
Natriumformiat	"	50	50	> 80	< 20



## Patentanspruch

Verfahren zur Anreicherung bzw. Reinigung von Biomolekülen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Biomolekül in einer Mischung aus Wasser und/oder  
5 einem Puffer und einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel löst und es bei der anschließend durch die Zugabe von Salzen herbeigeführten Phasentrennung in einer der sich trennenden Phasen anreichert, wobei der pH-Wert, bei dem die Anreicherung erfolgt, die  
Lösungsmittel, die sich für die Extraktion des Biomoleküls eignen, und die  
10 Art des Salzes in einer Versuchsreihe ermittelt werden.

15

20

25

30

35

40

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 90/02269

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>5</sup> C 07 K 3/24, C 12 N 15/15		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched :		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>5</sup>	C 07 K, C 12 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
X	Journal of Chromatography, Vol. 216, 1981, Elsevier Scientific Publishing Company, (Amsterdam, NL), V.Y. Ryashentsev et al.: "Behaviour of biomolecules in water-organic solvent- inorganic salt two-phase ternary systems", pages 346-349, see the whole document	1
A	R.K. Scopes "Protein purification", Second Edition, 1987, Springer-Verlag, (New York, US), pages 54- 63, see pages 55-62	1
A	Bull. Soc. Chim. Biol., Vol. 45, No. 1, 1963, (Paris, FR), M. Jutisz et al.: "Purification de l'hirudine", pages 55-67, see page 60	1
<p>* Special categories of cited documents: **</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"S" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
8 March 1991 (08.03.91)	2 April 1991 (02.04.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/02269

<b>I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGS-GE-GENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifizierungssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup> Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. <sup>5</sup> C 07 K 3/24, C 12 N 15/15											
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b> <div style="display: flex; justify-content: space-between; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;"> <span>Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup></span> <span>Klassifizierungssymbole</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; border-bottom: 1px solid black;"> <div style="width: 25%; padding: 5px;">Int.Cl.<sup>5</sup></div> <div style="width: 75%; padding: 5px;">C 07 K, C 12 N</div> </div> <p style="font-size: small; text-align: center;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup></p>											
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung<sup>11</sup>, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile<sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.<sup>13</sup></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">           Journal of Chromatography, Band 216, 1981, Elsevier Scientific Publishing Company, (Amsterdam, NL),            V.Y. Ryashentsev et al.: "Behaviour of biomolecules in water-organic solvent-inorganic salt two-phase ternary systems",            seiten 346-349            siehe das ganze Dokument  <div style="text-align: center;">---</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">           R.K. Scopes "Protein purification", Zweite Auflage, 1987, Springer-Verlag, (New York, US), Seiten 54-63            siehe Seiten 55-62  <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: right;">./.</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> </tbody> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>	X	Journal of Chromatography, Band 216, 1981, Elsevier Scientific Publishing Company, (Amsterdam, NL), V.Y. Ryashentsev et al.: "Behaviour of biomolecules in water-organic solvent-inorganic salt two-phase ternary systems", seiten 346-349 siehe das ganze Dokument <div style="text-align: center;">---</div>	1	A	R.K. Scopes "Protein purification", Zweite Auflage, 1987, Springer-Verlag, (New York, US), Seiten 54-63 siehe Seiten 55-62 <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: right;">./.</div>	1
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>									
X	Journal of Chromatography, Band 216, 1981, Elsevier Scientific Publishing Company, (Amsterdam, NL), V.Y. Ryashentsev et al.: "Behaviour of biomolecules in water-organic solvent-inorganic salt two-phase ternary systems", seiten 346-349 siehe das ganze Dokument <div style="text-align: center;">---</div>	1									
A	R.K. Scopes "Protein purification", Zweite Auflage, 1987, Springer-Verlag, (New York, US), Seiten 54-63 siehe Seiten 55-62 <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: right;">./.</div>	1									
<div style="font-size: x-small;">             * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:              "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist              "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist              "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)              "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht              "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist              "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist              "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden              "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist              "&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist           </div>											
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">8. März 1991</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">02 APR 1991</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Internationale Recherchenbehörde  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten  <div style="text-align: center;">             Mme N. KUIPER  </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; font-weight: bold;">8. März 1991</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; font-weight: bold;">02 APR 1991</div>	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;">             Mme N. KUIPER  </div>					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; font-weight: bold;">8. März 1991</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; font-weight: bold;">02 APR 1991</div>										
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;">             Mme N. KUIPER  </div>										

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>Bull. Soc. Chim. Biol., Band 45, Nr. 1, 1963, (Paris, FR), M. Jutisz et al.: "Purification de l'hirudine", Seiten 55-67 siehe Seite 60</p> <p>-----</p>	1